

تحديد الخلين باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية السائلة الشعرية في أشكال الجرعات الصيدلانية

د. محمد فراس مناع

عضو هيئة تدريسية - كلية الصيدلة - الجامعة الوطنية

خلاصة

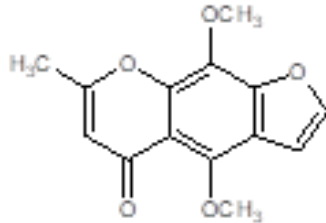
تم تطوير طريقة كروماتوغرافيا غازية شعرية حساسة ونوعية وسريعة لتحديد الخلين بالشكل النقي وفي الأشكال الصيدلانية، باستخدام كاشف تأين اللهب. تتضمن الطريقة ما يلي: استخلص وأذيب مسحوق من المضغوطات يحتوي على حوالي 25 ملغ من الخلين، في 10 مل من الكلوروفورم. أخذ 1 مل من هذا المحلول وعولج بـ 1 مل من الكافيين (5 ملغ/مل) كعيار داخلي، وتم تمديده إلى 10 مل بالكلوروفورم. هذا المحلول تم تحليله باستخدام عمود زجاجي شعري TRB-5 (30m×0.25mm, 0.25µm). قُيِّمت نتائج الاختبار ودراسات الاسترداد إحصائيًا للتأكد من صحتها ودقتها. كانت أزمدة الاحتفاظ حوالي 8.3 و 5.7 دقيقة للخلين والعيار الداخلي على التوالي. كان منحني المعايرة خطيًا في نطاق التراكيز من (10 إلى 400.0) ميكروغرام/مل من الخلين. كانت معاملات الارتباط (R^2) لمعادلات الانحدار أكبر من 0.998 في جميع الحالات. ولم يُلاحظ أي تداخل من أي من مكونات أشكال الجرعات الصيدلانية أو نواتج التحلل.

الكلمات المفتاحية: الخلين (Khellin)؛ الكروماتوغرافيا الغازية الشعرية (GLC)؛ الأشكال الصيدلانية (pharmaceutical dosage forms).

مقالة علمية مقتبسة من بحث علمي للباحث د. محمد فراس مناع

مقدمة

الخلين هو 4,9-Dimethoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g] [1] benzopyran-5-one وهو مشتق من الفورانوكرومون، معزول من نبات الخلّة البلدي، وقد ثبتت فعاليته الطبية لإمكانية استخدامه كعامل مضاد للتشنج لعلاج المغص الكلوي وتشنج مجرى البول (مرخ للعضلات الملساء). كما يُعدّ الخلين موسّعًا انتقائيًا قويًا للأوعية التاجية والشعب الهوائية، ويُستخدم أيضًا في الذبحة الصدرية. من ناحية أخرى، يُعدّ الخلين (نظرًا لتشابه تركيبه مع تركيب البسورالينات) دواءً فعالًا في العلاج الكيميائي الضوئي لمرض الجلد الأبيض (فقدان تصبغ الجلد والبهاق) ثلاث مرات أسبوعيًا [1,2]. تُظهر الدراسات أن الخلين هو دواء رسمي في دستور الأدوية الفرنسي [3]. تم تحديد الخلين باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء [4-6]، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة [7-9]، التحليل بطيف الفلورة [10،11]، التحليل الطيفي الضوئي [12،13]، التحليل الفولتامترية [14]، التحليل الاستقطابي [15]، الرحلان الكهربائي الشعري [16]، وكروماتوغرافيا الغاز مع كاشف التشرّد في اللهب [17،18].



الشكل (1): البنية الكيميائية للخلين

مع ذلك، تُعدّ التقنيات الآلية مثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، والفلورومتريّة، والرحلان الكهربائي الشعري، والتحليل الطيفي الضوئي، و التحليل الاستقطابي، و التحليل الفولتامترية نادرة مقارنةً بالتحليل الكروماتوغرافي الغازي السائل والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ، ولا توجد طريقة لتحديد الخلين باستخدام كروماتوغرافيا الغاز السائل الشعريّة. تهدف هذه الدراسة إلى تطوير واعتماد طريقة كروماتوغرافيا غازية شعريّة سريعة وموثوقة مع كاشف تأين اللهب لمراقبة جودة الخلين في صورته النقية وأشكاله الصيدلانية.

الأجهزة والشروط التجريبية

أُجريت قياسات هذه الدراسة باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الغاز CP-3800 (GC)، مقترناً بنظام كاشف تأين اللهب CP 3800 (FID)، ومُجهز بحاقن مع تجزئة/بدون تجزئة، من شركة Varian technologies Inc (الولايات المتحدة الأمريكية). أُجري التحليل باستخدام عمود شعري من نوع Teknokroma capillary column (30m×0.25mm, 0.25µm) TRB-5. حُقن حجم 0.5 ميكرو لتر من المحاليل القياسية ومحاليل العينات في وضع التجزئة بنسبة تجزئة 1:100، ودرجة حرارة الحاقن 280 درجة مئوية. تم الحفاظ على درجة حرارة فرن جهاز الكروماتوغرافيا الغازية عند 130 درجة مئوية في البداية لمدة دقيقة واحدة، ثم برمجت حتى 230 درجة مئوية بمعدل 20 درجة مئوية لكل دقيقة وحافظت عليها لمدة 5 دقائق، ثم رُفعت أخيراً بمعدل 10 درجات مئوية لكل دقيقة إلى درجة حرارة نهائية 250 درجة مئوية. استُخدم النيتروجين كغاز ناقل بمعدل تدفق ثابت قدره 3 مل لكل دقيقة. وضُبّطت درجة حرارة الكاشف عند 300 درجة مئوية. واستُخدمت حاقتة محكمة الغلق سعة 1 ميكرو لتر (SGE، أستراليا).

المواد

تم توفير الخلين ($C_{14}H_{12}O_5$, 260.25g/mole) من شركة Flower Extraction Sari (المغرب)، وبلغت نقاوته 98.5% كما تم توفير الكافيين اللامائي (Caffeine, $C_8H_{10}N_4O_2$, 194.19g/mole) من شركة Aarti Drugs Limited (الهند)، واستُخدم كعيار داخلي (I.S.)، وبلغت نقاوته 99.5% أما مضغوطات الخلين، فقد تم توفيرها من شركة شفاء (سوريا)، و شركة ابن الهيثم (سوريا)، و كل صنف كان معنون على العبوة بأن كل مضغوة تحتوي على 25 ملغ من الخلين. وتم شراء الكلوروفورم التحليلي من شركة ميرك (ألمانيا) واستُخدم في تحضير جميع المحاليل.

المحاليل العيارية

حُضِر محلول الخلين العياري بوزن كمية بدقة من المادة، ثم أُذيب في الكلوروفورم. كان تركيز المحلول العياري الأولي 5.0 ملغ/مل. حُضِر محلول العياري الداخلي العياري الأولي بتركيز 5.0 ملغ/مل عن طريق إذابة كمية مناسبة من المركب في الكلوروفورم. تم تخزين هذه المحاليل في مكان مظلم عند درجة حرارة تتراوح بين 2 و 8 درجات مئوية، بقيت محافظة على ثباتها لمدة شهر على الأقل. حُضِرَت سلسلة من محاليل العمل العيارية للخلين (10 - 400.0 ميكروغرام/مل) عن طريق تمديد أحجام مختلفة من المحلول القياسي الأولي بالكلوروفورم. أُضيف إلى كل محلول أضيف العياري الداخلي بحيث يكون تركيزه ثابت في كل محلول 500.0 ميكروغرام/مل. حُضِرَت محاليل العمل العيارية يومياً، ووجد أنها ثابتة خلال فترة التحليل.

منحنى المعايرة

لإنشاء المنحنى العياري للخلين، حُفِنَت خمس مكررات (0.5 ميكرو لتر) من كل محلول عمل عياري في العمود مباشرة بعد التحضير، وتم قياس مساحة قمم الكروماتوغرامات. بعد ذلك، رُسم متوسط نسبة مساحة قمة خلين إلى متوسط مساحة قمة العياري الداخلي (I.S.) مقابل تركيز خلين المقابل (10.0 - 400.0 ميكروغرام/مل) للحصول على المخطط بياني للمعايرة (الجدول 1).

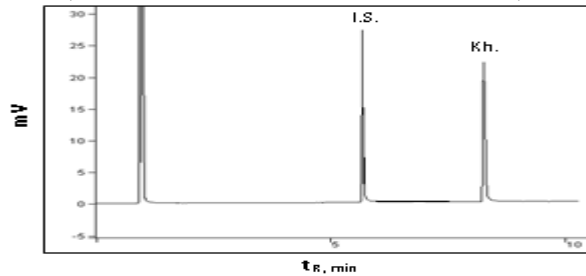
معايرة الأشكال الصيدلانية (المضغوطات)

وُزن عشرون قرصًا تحتوي على خلين من كل تركيبة، ثم طُحنت جيدًا وخلطت. نُقلت خمس كميات من المسحوق، موزونة بدقة، تعادل 25 ملغ من خلين، إلى دوارق حجمية معايرة سعة 10 مل، وأُذيبت في 8 مل من الكلوروفورم. تم تحريك المزيج وتعريضه لحمام الموجات فوق الصوتية لمدة 15 دقيقة، ثم أُكمل الدورق بالكلوروفورم حتى وصل حجمها إلى 10 مل. رُشحت محاليل العينات. حُصِر تركيز مناسب بتمديد 1 مل من كل رشاحة بالكلوروفورم إلى 10 مل في دوارق حجمية تحتوي على 500.0 ميكروغرام/مل من محلول العياري الداخلي I.S. وأخيرًا، حُقن 0.5 ميكرو لتر من كل عينة ممددة في العمود، وسُجّلت البيانات. ثم قيسَت نسبة مساحة قمة الخلين إلى مساحة قمة العياري الداخلي لتحديد النتائج. تم بعد ذلك حساب تراكيز الخلين في العينات باستخدام بيانات القمم والمنحنيات العيارية.

النتائج والمناقشة

الكروماتوغرافيا

هدفت هذه الدراسة إلى تطوير طريقة تحليلية باستخدام كروماتوغرافيا الغاز الشعيرية مع كاشف التشتت في اللهب -GLC-FID لتحليل الخلين بالشكل النقي وفي الأشكال الصيدلانية. أُجريت عمليات الفصل الكروماتوغرافي باستخدام عمود شعيري، مما أدى إلى ظهور قمم حادة وفصل جيد للمواد الدوائية. أدت برمجة درجة حرارة الفرن إلى ظهور قمم حادة ومتناظرة، وذلك بضبط درجة حرارة الفرن على 130 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، ثم برمجتها على 230 درجة مئوية بمعدل 20 درجة مئوية/دقيقة، مع الحفاظ عليها لمدة 5 دقائق، ثم رفعها بمعدل 10 درجات مئوية/دقيقة إلى درجة حرارة نهائية قدرها 250 درجة مئوية. يوضح الشكل 2 النوعية لطريقة كروماتوغرافيا الغاز الشعيرية المطورة، حيث لوحظ الفصل الكامل للمركبات. تم تمليص الخلين بعد حوالي 8.3 دقيقة، بينما تم تمليص العياري الداخلي I.S بعد حوالي 5.70 دقيقة.



الشكل (2) مخطط استشراب غازي مع كاشف التشتت في اللهب GLC-FID نموذجي يمثل امتلاص محلول عياري يحوي الخلين بتركيز 400.0 ميكروغرام/مل والعياري الداخلي (الكافئين) بتركيز 500.0 ميكروغرام/مل ومستوى تدفق 3 مل/دقيقة مع برنامج حراري.

الخطية وحدود القياس والكشف

وُجد أن مخطط العلاقة بين استجابة مساحة القمة الخلين مع تركيز الخلين هو خطي على نطاق تركيز يتراوح بين 10 و 400 ميكروغرام/مل. أبدى منحنى المعايرة ($n = 5$) عن تقاطع صغير جدًا (0.028) وعلاقة خطية جيدة ($R^2 > 0.998$) بين نسبة مساحة القمة للخلين إلى مساحة قمة العياري الداخلي والتركيز. كانت معادلة المنحنى العياري هي $y = 0.004x + 0.128$ ، كما هو موضح في الجدول (1).

تم تقييم حساسية الطريقة المقترحة من خلال تحديد الحد الأدنى الذي يمكن عنده الكشف عن المركبات المدروسة بشكل موثوق (حد الكشف، LOD) وتحديد كميتها (حد التحديد الكمي، LOQ) تجريبيًا. تم التعبير عن حد الكشف كتركيز الدواء الذي وُلد استجابة لثلاثة أضعاف نسبة الإشارة إلى الضجيج (S/N)، وكان حد التحديد الكمي LOQ عشرة أضعاف نسبة الإشارة إلى الضجيج (S/N). وُجد أن حد الكشف للخلين المُحدّد وفقًا لتعريف الاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية IUPAC [19,20]، حد الكشف $LOD_{(k=3)} = k \times S_a / b$ حيث b هو ميل منحنى المعايرة و S_a هو الانحراف المعياري

للتقاطع مع محور مساحات القمم، هو 1.50 ميكروغرام/مل. كما وُجد حد التحديد الكمي وفقًا لتعريف الاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية IUPAC، يعرف كما يلي حد الكشف $LOQ_{(k=10)} = k \times S_a / b$ ، وهو 5.00 ميكروغرام/مل.

الجدول (1): المقاييس العيارية لتحديد الخلين باستخدام كروماتوغرافيا الغاز الشعرية مع كاشف التشنج في اللهب

المقاييس العيارية	الخلين
المجال الخطي المضبوط للتركيز، ميكروغرام /مل	10.0– 400.0
معادلة الانحدار (الارتباط) من أجل العلاقة بين نسبة مساحة قمة الخلين إلى مساحة قمة العياري الداخلي (الكافئين) مع تراكيز الخلين بالميكروغرام /مل .	$R_{\text{khellin/caffeine}} = 0.004 C_{\text{khellin}} + 0.128$
(R^2) معامل الارتباط الخطي	0.998
الانحراف المعياري للتقاطع	0.002
حد الكشف، (LOD) ميكروغرام /مل	1.50
حد التحديد الكمي، (LOD) ميكروغرام /مل	5.00

الدقة والضبط

تم تقييم دقة و صحة الطريقة GC-FID. تم اختبار وتحديد الانحراف المعياري، والانحراف المعياري النسبي، ونسبة الاسترداد، والانحراف المعياري النسبي للمحاليل القياسية. ولم يتجاوز الانحراف المعياري النسبي المئوي (RSD%) 3.82%، مما يدل على دقة جيدة، كما هو موضح في الجدول (2). وتدل نسبة الاسترداد الممتازة (98.73–102.80%) على صحة الطريقة، والدقة يدعمها الانحراف المعياري المنخفض. واستُنتج من الجدول (2) أن الطريقة تُعطي دقة وضبطاً (صحة) مقبولين للعينة المحللة. وتشير الدقة والضبط (الصحة) المُرضيان إلى الأداء الجيد لطريقة كروماتوغرافيا الغاز الشعرية مع كاشف التشنج في اللهب GLC-FID في التحليل الكمي للخلين.

الجدول (2) الصحة والدقة من أجل تحديد الخلين باستخدام طريقة كروماتوغرافيا الغاز الشعرية المطورة

التركيز المأخوذ ميكروغرام /مل	التركيز المحدد ميكروغرام /مل Mean ^a ±S.D. (المتوسط ± الانحراف المعياري)	RSD %	Recovery% (الاسترجاعية)
10.0	10.28±0.39	3.79	102.80
25.0	25.61±0.82	3.20	102.44
50.0	51.33±1.57	3.06	102.66
100.0	98.73±2.67	2.71	98.73
150.0	148.60±3.61	2.43	99.07
200.0	202.47±4.62	2.28	100.24
250.0	252.87±5.23	2.07	101.15
300.0	303.73±5.95	1.96	101.24
350.0	354.63±6.03	1.70	101.32
400.0	406.20±6.13	1.51	101.55

متوسط القيم تعبر عن خمسة قياسات مأخوذة

التطبيقات

تم اختبار قابلية تطبيق الطريقة المقترحة من خلال تحليل المستحضرات الصيدلانية التجارية. أُجريت الاختبارات وفقًا لطريقة العمل للأشكال الصيدلانية (المضغوطات). في جميع المستحضرات، تم الحصول على كمية الخلين عن طريق القياس المباشر باستخدام المنحني العياري. وللمقارنة، تم تحديد محتوى الخلين في المستحضرات الصيدلانية أيضًا باستخدام الطريقة المرجعية [4–6]. في جميع المستحضرات الصيدلانية، وُجدت النتائج جيدة جدًا، الجدول (3)، مما يؤكد صحة الطريقة

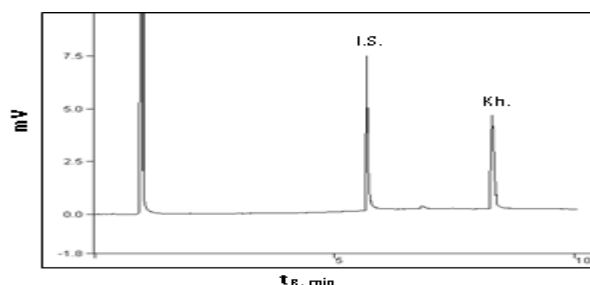
المقترحة. تم تحليل صيغتين صيدلانيتين من الخلين. يوضح الشكل (3) مخططاً كروماتوغرافياً نموذجياً للخلين (250 ميكروغرام/مل) في الكلوروفورم المحضر من مضغوطات الخلين بوجود العياري الداخلي بتركيز (500 ميكروغرام/مل). يوضح الجدول (3) نتائج تحديد مستحضرين صيدلانيين السوق السورية المحلية باستخدام الطريقة المقترحة والطريقة المرجعية. لوحظ توافق جيد مع النتائج التي تم الحصول عليها بالطريقة المرجعية. أُجريت مقارنة إحصائية بين النتائج التي تم الحصول عليها من الطريقتين المقترحة والمرجعية. لم تتجاوز قيم t و F المحسوبة القيم النظرية عند مستوى ثقة 95% ، مما يُشير إلى عدم وجود أي فرق بين الطريقتين.

الجدول (3) تحديد الخلين في الصيغ الصيدلانية (المضغوطات) باستخدام الطريقة المقترحة والطريقة المرجعية

المستحضرات الصيدلانية التجارية	% Khellin found ^a ± SD	
	± SD النسبة المئوية للخلين المحدد	
	الطريقة المقترحة	[4] الطريقة المرجعية
خلين (شفا) 25 ملغ / مضغوة	99.88±0.15	99.21±1.34
	$t=1.58$	$t=1.31$
	$F=1.45$	
خلين (ابن الهيثم) 25 ملغ / مضغوة	100.03±0.70	100.34±1.60
	$t=0.09$	$t=0.48$
	$F=0.03$	

^a (خمسة تحاليل مستقلة . عند مستوى ثقة 95% قيمة t هي (2.776) وقيمة F هي (6.26) .)

يوفر الإجراء الموصوف هنا طريقة سريعة لتحديد مادة الخلين في المواد الخام والمضغوطات، وذلك بفضل بساطته ، دقته ، صحته، وإمكانية تكرار نتائجه. كما يوفر مزايا عملية واقتصادية كبيرة مقارنةً بالطرق الآلية الأخرى. وبالتالي، تُعد هذه الطريقة مناسبة للتحليل الروتيني لمستحضرات مضغوطات الخلين دون أي تدخل من مكونات الأشكال الصيدلانية (سواغات ومواد مضافة)، أو نواتج التخرب.



الشكل (3) مخطط استشرابي نموذجي لمزيج من الخلين (Kh) 250 ميكروغرام /مل والعياري الداخلي (IS) بتركيز 500 ميكروغرام /مل في الكلوروفورم كمذيب محضر من مضغوطات الخلين .

الخلاصة

يمكن تحديد الخلين في شكله النقي وفي المضغوطات باستخدام طريقة كروماتوغرافيا الغاز الشعرية مع كاشف التشرّد في اللهب GC-FID البسيطة، السريعة ، الصحيحة ، الحساسة ، الدقيقة، والتي تتطلب كمية ضئيلة من المواد الكيميائية والمذيبات. وقد طُوّرت طريقة كروماتوغرافيا الغاز الشعرية مع كاشف التشرّد في اللهب GC-FID جيدة جداً وحديثة لتحديد الخلين في الأشكال الصيدلانية. وقد أثبتت هذه الطريقة المطورة دقةً وخصوصيةً في تحليل الدواء، سواءً بشكل منفرد أو في مزيج مع الكافيين اللامائي (العياري الداخلي) وقد مكنتنا الخصوصية العالية والقدرة على الفصل وتحديد لطريقة كروماتوغرافيا الغاز الشعرية مع كاشف التشرّد في اللهب GC-FID المطورة من تحليل مزائج المادتين الدوائيتين قيد الدراسة دون الحاجة إلى خطوات فصل مسبقة.

المراجع

- [1]. Budavari S., **2007–The Merck Index**, An Encyclopedia of Chemicals, Drug and Biologicals, 19th Ed., Merck&Co., Inc., New Jersey, USA.
- [2]. Parfitt K., **2007– Martindale the Complete Drug Reference**, 35th Ed. Pharmaceutical Press, Taun JIMÉNEZ ton, Massachusetts, USA, Vol. 1.
- [3]. **France Pharmacopeia, 2004.**
- [4]. El-Yazigi A., Said S.A., **1980–Khellin Determination in Human Serum And Urine by High–Performance Liquid Chromatography**, Journal of pharmaceutical sciences, 69(12), 1434–1436.
- [5]. Abounassif M.A., Gad–Kariem E.A.,Wahbi A.M, **1990– High Performance Liquid Chromatographic Determination of Khellin, Phenobarbitone and Dipyrone Combination in Tablets**, , Farmaco, 45(4), 465–72.
- [6]. El–Domiaty M.M., **1992–Improved High–Performance Liquid Chromatographic Determination of Khellin and Visnagin in Ammi Visnaga Fruits and Pharmaceutical Formulations**, Journal of pharmaceutical sciences, volume 81,Issue 5,pages 475–478.
- [7]. Karawya M.S., El–Kiey M.A., Sina A., Nour G., **1970– Simultaneous TLC Separation of Khellin and Visnagin and Their Assay in Ammi Visnaga Fruits , Extracts, and Formulations**, Journal of pharmaceutical sciences, 59(7), 1025–1027.
- [8]– Bebawy L.I., EL–Tantawy M.E., EL.Bayoumi A.,**1998–Thin Layer Chromatographic Scanner Method For The Determination of Some Natural Products in Raw Materials and Pharmaceutical Preparations**, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 21(5), 741–753.
- [9]. Prokopenko A.P., Zhukov G.A., Zaitsev V.G., **1968– Quantitative Determination of Khellin by Thin Layer Chromatography**, Pharmaceutical chemistry Journal, volume 2,Number 9,517–518.
- [10]. Mawatari K., Mashiko S., Watanabe M., Nakagomi K., **2003– Fluorometric Determination of Khellin in Human Urine and Serum by High–Performance Liquid Chromatography Using Postcolumn Photoirradiation**, Anal Sci, 19(7), 1071–1073.
- [11]. Abdel–Salam M.A., Abdel–hamid M.E., Mahmoud Z.P., **1985– Spectrofluorimetric Determination of Khellin and Visnagin in Combination**, Analytical Letters, 18(1), 35–49.
- [12]. Ibrahim S.M., Kadry H.A., EL–Olemy M.M., **1979–Use of Acide–Dye Technique in the Analysis of Natural Products. III. Spectrophotometric Microdetermination of Khellin and Bergapten**, Journal Of Natural Products, 42(4),PP 366–373.

- [13]. Abu-shady H., Girgis E.H., **1977– Spectrophotometric Determination of 3-Dimethylaminomethylkhellin Hydrochloride and Khellin**, Journal of pharmaceutical Sciences, 67(5), 618–621.
- [14]. Radi A., **1999–Voltammetric Study of Khellin at a DNA-Coated Carbon Paste Electrode**, Analytica Chimica Acta, 386(1–2), 63–68.
- [15]. Burke M.M., Flanagan T.L., Young R.L., Bailey S.D., Heming A.E., **1952– Khellin. Part III. Polarographic Determination of Khellin in Serum**, Journal of American pharmaceutical Association, 41(7), 379–382.
- [16]. Gunaydin K., Erim F.B., **2002–Determination of Khellin and Visnagin in Ammi Visnaga Fruits by Capillary Electrophoresis**, Journal of Chromatography A, 954(1–2), 291–294.
- [17]. Said S.A., Babikar K.H., **1981– GLC assay of Khellin in Human Serum and Urine**, Chromatographia, 14(7), 425–427.
- [18]. Carlin A., Simmons J.E., EL-Arini S.K., Shiu G.K., **1993–Determination of Khellin in Serum by Gas Chromatography**, Journal of Chromatography B:Biomedical Sciences and Applications, 614(2), 324–327.
- [19]. LONG G.L., WINEFORDNER J.D., **1983– Limit of Detection. A Closer Look at the IUPAC Definition**, Analytical Chemistry, 55(7), 712A–721A.
- [20]. MILLER J.C., MILLER J.N., **1993– Statistical in Analytical Chemistry**, 3rd Ed, Ellis Horwood, Chichester, 119 pp.